

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/87058 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04034
- (22) 国際出願日: 2001 年 5 月 15 日 (15.05.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-147467 2000 年 5 月 15 日 (15.05.2000) JP
特願2000-221069 2000 年 7 月 17 日 (17.07.2000) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 垣生園子 (HABU, Sonoko) [JP/JP]; 〒206-0012 東京都多摩市貝取2-6-6-402 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒253-0037 神奈川県茅ヶ崎市菱沼海岸 7-66-311 Kanagawa (JP). 堀田知光 (HOTTA, Tomomitsu) [JP/JP]; 〒468-0015 愛知県名古屋市中天白区 原 5-1201 Aichi (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHIMERIC MOUSE HAVING IMMUNITY CONSTRUCTED BY USING HUMAN CD34-POSITIVE CELLS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: ヒト CD34 陽性細胞による免疫構築キメラマウスとその用途

(57) Abstract: A chimeric mouse is constructed by transferring human CD34-positive cells (hematopoietic stem cells) into an SCID mouse. In this chimeric mouse, hematopoietic stem cells continuously differentiate into immune cells. Owing to this characteristics, the chimeric mouse can be immunized over a long time, which makes it possible to obtain a human antibody against an arbitrary antigen containing a human self-component.

(57) 要約:

SCID マウスにヒト CD34 陽性細胞 (造血幹細胞) を移入することにより、ヒト免疫系を有するキメラマウスを作製した。本発明のキメラマウスは、造血幹細胞から免疫系細胞が持続的に分化してくるため長期に渡る免疫が可能であり、ヒト自己成分を含む任意の抗原に対するヒト抗体の取得が可能である。

WO 01/87058 A1

明細書

ヒトCD34陽性細胞による免疫構築キメラマウスとその用途

技術分野

本発明は、ヒト抗体産生能を有するキメラマウス、該キメラマウスを用いたヒト抗体の作製方法、並びに該方法により調製されるヒト抗体に関する。

背景技術

1975年にケラーとミルスタインが細胞融合技術を確立して以来(Kohler, Nature, 256, 495-497 (1975))、種々のモノクローナル抗体が作製され、各種試料の測定、病気の診断、あるいは治療に応用されてきている。当初作製されたモノクローナル抗体は、ほとんどが動物、特にマウス由来であり、病気の治療を目的とする医薬用途として用いる場合には、抗体自体の免疫原性、あるいは早い血中半減期が懸念され、特に慢性疾患に投与する場合には頻回投与が必要であることから、治療薬としての応用には限界があった。ついで免疫原性を低下させることを目的として、マウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなるキメラ抗体が作製され、さらに、抗原結合活性に必須である相補性決定領域(CDR)のみをヒト抗体に移植したヒト型化抗体が作製された。しかしながら、最も抗原性の低い抗体はヒト抗体産生細胞に由来するヒト抗体であり、均質なヒト抗体であるヒトモノクローナル抗体は治療薬の分野で有用である。

ヒトモノクローナル抗体の作製方法としては、所望の抗体を血中に有するヒトからヒト抗体産生細胞を取得し、ついで当該細胞を不死化することでヒト抗体産生細胞クローンを得る方法が知られている(特開平5-25058)。しかしながら、この方法では、所望の活性を有する抗体を産生する細胞を分離しなければならず、目的に応じたヒト抗体を任意に取得することは困難であった。

近年、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニックマウスを作製し、ついで抗原で免疫することで抗原特異的ヒト抗体産生マウス細胞を取得し、これをミエローマ細胞との融合等により不死化することでヒトモノクローナル抗体を作製する技術が報告された（国際公開番号 W092-03918, W093-02227, W094-02603, W094-25585, W096-33735）。しかしながら、公報記載のトランスジェニックマウスの作製には時間と労力を要し、簡便ではない。また、この方法で生産される抗体は後述のようにマウス由来の糖鎖を含む。

一方、ヒトリンパ球を有するキメラマウスを作製し、当該キメラマウスを抗原で免疫することで抗原特異的ヒト抗体を作製しようとする試みがなされてきた。宿主としては拒絶反応をおこしにくいこと、およびマウス由来の抗体が産生しない点から重篤複合免疫不全(severe combined immunodeficiency disease ; SCID)マウスが用いられてきた。SCID マウスは、Balb/c マウスの免疫グロブリン重鎖のアロタイプ共通遺伝子系マウスである C.B.-17 マウスより、血中免疫グロブリン濃度の極端に低いマウスとして発見された(Nature, 301, 527 (1983))。このマウスは重症の免疫不全を呈しており、免疫系の主要な担当細胞である成熟 T 細胞、および B 細胞が欠損していることが明らかにされている (J. Immunol. 132, 1084 (1984))。T 細胞および B 細胞の成熟には、それぞれ T 細胞受容体や膜型免疫グロブリン分子の発現が必要であるが、SCID マウスでは、これらの分子を発現する為に不可欠な遺伝子の再構築を担う酵素（リコンビナーゼ）群に異常があり、特に、リコンビナーゼの基質特異性に欠陥のあることが示されている (J. Immunol. 134, 227 (1985))。その為、SCID マウスでは、T 細胞と B 細胞はほとんど未熟な段階に留まっており、外来抗原に対する抗体はもちろんのこと、自己に対する抗体もほとんど産生されず、従って、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) も認められない。一方、抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell: APC) や NK 細胞の機能については異常は認められていない (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3427 (1988); Cell 55, 7 (1988))。

このような SCID マウスの特性を利用して、異種動物の各種組織、特にヒトリンパ球などを移植してヒト免疫機能を再構築する方法が試みられている。例えば、ヒト胎児胸腺と胎児肝の小片を腎皮膜下に組織学的構造を保持したまま移植した SCID-hu マウス(Nature, 251, 791 (1991))、また、ヒト末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocyte: PBL)を腹腔内に移植した hu-PBL-SCID マウス(Science 247, 564 (1990))が知られている。hu-PBL-SCID マウスでは、破傷風毒素や B 型肝炎ウイルス C 抗原に対する特異的ヒト抗体を誘導できることが報告されている(J. Exp. Med. 173, 147 (1991))。

しかしながら、末梢血リンパ球は既に分化したリンパ球であるためその生存期間が短く、これを移入したキメラマウスでは長期に渡る免疫ができず、また、末梢血リンパ球は既に自己に適応して成熟分化した細胞であることから、ヒトの成分に対する抗体(自己抗体)は産生することができない等の欠点があった。

さらには、産生される抗体クラスは多くの場合 IgM であり、親和性成熟(affinity maturation)を誘導することで、結合親和性のより高い IgG クラスの抗体を取得することは困難であった。また、抗体を医薬品として用いる場合には、生産方法や精製の容易さから IgG クラスの抗体であることが望まれていた。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、ヒト自己抗体を含む目的とする任意の抗体の産生および長期に渡る免疫が可能なキメラマウスを構築し、該マウスを用いてヒト抗体を調製することを目的とする。

より詳しくは、本発明は、ヒト CD34 陽性細胞を SCID マウスへ移入することにより構築されたヒト免疫系を有するキメラマウス、該キメラマウスを用いたヒト抗体の調製方法、および該方法により調製されたヒト抗体を提供する。

本発明の好ましい態様において、ヒト臍帯血から採取したヒト CD34 陽性細胞を SCID マウスへ移入することにより構築されたヒト由来の成熟 B 細胞およびヒ

ト由来の成熟 T 細胞を有するキメラマウスを提供する。さらに、本発明の他の好ましい態様において、IgG を産生するように誘導されたキメラマウスを提供する。

造血幹細胞はすべての血球系の細胞を発生分化させる多能性の細胞であり、B 細胞や T 細胞などのリンパ球もすべて造血幹細胞に由来する。本発明者等は、造血幹細胞のこのような特性に着目し、ヒト造血幹細胞をマウスに移入することにより、末梢血リンパ球を移入する従来法の問題点を解決し得ると考えた。即ち、ヒト造血幹細胞を移入されたキメラマウスは、その体内でヒト T 細胞およびヒト B 細胞を持続的に発生分化させるため、短命の末梢血リンパ球を利用する従来法よりも持続的な免疫が可能であり、また、ヒト T 細胞およびヒト B 細胞はマウス体内で成熟分化しているため、ヒト体内で適応して成熟分化した末梢血リンパ球をマウスへ移入する従来法のように、自己抗体の産生ができないという欠点もないと考えた。

そこで、本発明者等は、かかる着想に基づき、ヒト造血幹細胞が移入されたキメラマウスの作製を試みた。まず、ヒト臍帯血から CD34 陽性細胞を調製し、これを造血幹細胞を含む細胞群とし、これをレシビエントマウスの尾静脈から移入することによりキメラマウスを作製した。レシビエントマウスとしては、マウス抗体産生能を消失しており、NK 細胞の活性が低下しているため拒絶反応が生じにくい NOD-SCID マウスを選択した。本発明者等は、これにより得られたキメラマウスを抗原で免疫しヒト抗体の産生の検討を行った。その結果、該キメラマウスが抗原特異的なヒト IgM およびヒト IgG を産生することを見出した。

さらに、本発明者等は、CD34 陽性ヒト細胞とマウス胸腺ストローマ細胞のハイブリッド凝集法 (RTOC 法) にて調製した細胞を NOD-SCID マウスの両腎皮膜下に移植することで、該マウス体内において CD34 陽性ヒト細胞から成熟 T 細胞を誘導できることを見出した。即ち、本発明者等は、完全に再構成されたヒト免疫系を有するキメラマウスを作製することに成功した。

このキメラマウスはヒト由来の成熟 B 細胞および成熟 T 細胞を有しているため、これを用いればヒト自己成分を含む任意の抗原に対する抗体の作製が可能である。また、該キメラマウスまたはそれに由来する脾細胞などの免疫担当細胞を、ヒト CD40 リガンドなどのヘルパー因子で刺激して抗体クラススイッチを誘導すれば、効率的な IgG の産生を行うことも可能である。

本発明は、以上の知見に基づき完成されたものであり、ヒト CD34 陽性細胞を SCID マウスへ移入することにより構築されたヒト抗体産生能を有するキメラマウス、該キメラマウスを用いたヒト抗体の調製方法、および該方法により調製されたヒト抗体を提供する。

より詳しくは、本発明は、

- (1) SCID マウスにヒト CD34 陽性細胞を移入することを特徴とする、ヒト抗体産生能を有するキメラマウスの作製方法、
- (2) SCID マウスに、ヒト CD34 陽性細胞の移入に加えて、さらにハイブリッド凝集法により調製された CD34 陽性細胞を移入することを含む、(1)に記載の方法、
- (3) ヒト CD34 陽性細胞が、ヒト臍帯血由来である(1)または(2)に記載の方法、
- (4) (1)から(3)のいずれかに記載の方法により作製されたキメラマウス、
- (5) ヒト由来の成熟 B 細胞および成熟 T 細胞を有し、ヒト抗体産生能を有するキメラマウス、
- (6) (1)から(3)のいずれかに記載の方法により作製された(5)に記載のキメラマウス、
- (7) ヒト CD34 陽性細胞に由来するヒト T 細胞および／または B 細胞を持続的に保持するキメラマウス、
- (8) ヒト抗体を調製する方法であって、

6

(a) (4) から (7) のいずれかに記載のキメラマウスまたは該キメラマウスから調製されたリンパ球を抗原で免疫する工程、および

(b) 工程 (a) における免疫により産生された、該抗原に結合するヒト抗体を回収する工程、を含む方法。

(9) 工程 (a) において、CD40 を活性化する物質の、キメラマウスへの投与またはリンパ球への接触を行う、(8) に記載の方法、

(10) (8) または (9) に記載の方法により調製されたヒト抗体、

(11) 抗体のクラスが IgG である、(10) に記載の抗体、を提供するものである。

なお、本発明において「ヒト CD34 陽性細胞」とは、細胞の表面に抗原として CD34 を有する、造血幹細胞を含む細胞群を意味する。また、本発明において「ヒト抗体産生能を有するキメラマウス」とは、抗原の投与により該抗原に結合するヒト抗体を産生する能力を有するキメラマウスを意味する。

本発明においては、重篤複合免疫不全(severe combined immunodeficiency disease)を呈するマウス(SCID マウス)にヒト CD34 陽性細胞を移入することにより、ヒト抗体産生能を有するキメラマウスを作製する。

本発明において用いる CD34 陽性細胞の由来としては特に制限はないが、ヒト臍帯血由来のものを好適に用いることができる。この場合、ヒト CD34 陽性細胞は、ヒト臍帯血から分離した直後の細胞でもよいし、一旦培養し、凍結保存した細胞であってもよい。培養は、マウス骨髓ストローマ細胞株(例えば HESS-5)をフィーダー細胞とし、ヒト SCF、ヒト TPO、ヒト Fl-2 を添加して行うとよい(Experimental Hematology 27, 904 (1999))。これら分子の添加量としては、50ng/ml 程度が好適である。ヒト CD34 陽性細胞は、例えば、実施例 1 に記載のように、市販のキットを利用して調製することができる。

本発明においてヒト CD34 陽性細胞を移入するマウスとしては、通常の SCID マウスを用いることができる。しかしながら、該マウスを用いた場合には、移植 C

D34 陽性細胞に対し NK 細胞の作用に基づく細胞傷害が生じ、これにより移入細胞の生着率が低下する場合がある。このような移入細胞の生着率の低下を防止するために、本発明においては、NK 細胞の活性が低下した SCID マウスである NOD-SCID マウスを用いると好適である。

SCID マウスおよび NOD-SCID マウスは、既に文献(Nature, 301, 527 (1983)、J. Immunol. 154, 180 (1995))により公知であり、実験動物供給会社から入手することができる(例えば、ジャクソンラボラトリー)。

また、NK 細胞の活性をさらに低下させる目的で、NK 細胞の特異的抗体を該マウスに投与することも有効である。NK 細胞の特異的抗体としては、例えば、抗アシアロ GM1 抗体が挙げられるが、これに制限されない。

さらに、ヒト CD34 陽性細胞の生着率の向上のために、該細胞の移入時に、放射線照射(15Gy 程度が好適である)したヒト末梢血リンパ球をアクセサリー細胞として移入することも有効である。移入のためのアクセサリー細胞数は、移入細胞数と同程度であることが好ましい。ヒト末梢血リンパ球は、CD34 陽性細胞と同一の者に由来してもよく、異なる者に由来してもよい。

マウスへのヒト CD34 陽性細胞あるいはアクセサリー細胞の移入の方法は、これら細胞を血流内に入れることができれば移入経路は問わないが、手技的に簡便な点で、尾静脈注射が好ましい。

キメラマウスがヒト抗体を効率よく産生するためには、該マウスにおける B 細胞および T 細胞が共にヒト由来の細胞であることが好ましい。このように完全なヒト免疫系が再構築されたキメラマウスを作製するには、レシピエントマウスにヒト CD34 陽性細胞を移入すると共に、ハイブリッド凝集法(RTOC 法: Immunol. Letter 71, 61 (2000); J. Exp. Med. 176, 845 (1992))により調製したヒト CD34 陽性細胞を移入すればよい。RTOC 法においては、例えば、マウス胎児胸腺をデオキシグアノシン(deoxiguanosine; dGuo)にて処理後、上皮細胞を採取し、ヒト CD34 陽性細胞と再凝集した後、これを 1 週間程度培養することにより、レ

シピエントマウスへ移入するためのヒト CD34 陽性細胞凝集塊を調製する。ヒト CD34 陽性細胞を SCID マウスに尾静脈から移入すると共に、このようにしてハイブリッド凝集法で調製したヒト CD34 陽性細胞凝集塊を SCID マウスの腎皮膜下に移植することにより、完全なヒト免疫系を有するキメラマウスを構築することができる。なお、図 1 にヒト CD34 陽性細胞とマウス胸腺ストローマ細胞によるハイブリッド凝集法の概略を示した。

また、キメラマウスにおける効率的なヒト抗体の産生のためには、RTOC 法により調製したヒト CD34 陽性細胞を移入して成熟 T 細胞を分化誘導させる方法の他、例えば、可溶性の T 細胞由来因子を投与してヒト T 細胞の役割を代替させる方法を利用することも可能である。T 細胞由来因子としては、例えば、ヒト CD40 リガンド(hCD40L)を用いることができる。これまでに、*in vitro*培養系に hCD40 L, IL-4 および IL-10 を添加することで IgG クラスの抗体を産生する細胞を取得したことが報告されている(Blood 92, 4501 (1998))。また、ヒト末梢血を SCID に移植し、ディフテリア・テタヌストキソイド(DT)で免疫する際、抗 CD40 抗体を同時投与すると、IgM のみならず、IgG クラスの抗 DT 抗体が得られたことが報告されている(Clinical Immunol. 90, 4632 (1999))。さらには、マウスに T 細胞非依存性抗原を免疫する際に、抗 CD40 抗体を同時投与すると、抗原特異的 Ig G 抗体が出現することが報告されている (Nature Medicine 4, 88 (1998))。従って、マウスに hCD40L を産生する形質転換細胞を移入する、あるいは hCD40L または抗 hCD40 抗体を投与して、CD40 を活性化することにより、IgG 産生細胞をさらに効率よく取得することが可能である。具体的な手法としては、例えば、hCD40L (2 μ g)あるいは抗 CD40 抗体(2 μ g)を隔日 (2 日毎) に計 10 回投与すればよい。また、抗 CD40 抗体を、好ましくは 1~50 μ g/head、さらに好ましくは 5~30 μ g/head、最も好ましくは 10~20 μ g/head で合計 10 回程度投与してもよい。

hCD40L としては、例えば、同分子を産生する HeLa 細胞の形質転換細胞から精製したものをを用いることができる。また、抗 hCD40 抗体としては、例えば、マウ

スハイブリドーマ (5C3) 由来のモノクローナル抗体を精製したものをを用いることができる。

これにより作製されたキメラマウスは、抗原の投与により、該抗原に結合するヒト抗体を産生することができる。抗原の投与および産生されたヒト抗体の回収は、当業者に公知の方法で行うことができる（実施例 3 参照）。

ヒト抗体の調製においては、抗原で本発明のキメラマウスを直接免疫する方法以外に、該キメラマウスから調製したリンパ球を *in vitro* で抗原感作する方法を利用することもできる。*In vitro* で抗原感作する方法としては、公知の方法を用いることができる (Arai, Experimental Medicine, 6, 897-903 (1988))。抗原感作するリンパ球は、例えば、脾細胞由来のものを用いることができる。

In vitro においても、効率的な IgG 生産のために、ヘルパー因子を利用して、抗原特異的抗体産生細胞クローンの拡張とクラススイッチの誘導を行うことが有効である。具体的な手法としては、例えば、hu-SCID (CD34 陽性細胞の移入されたキメラマウス) に抗原刺激を一回行った後、7 日後に脾細胞を採取し、*in vitro* でヘルパー因子と共に抗原を培養系に添加して再刺激する。ヘルパー因子としては、可溶性 hCD40L、IL-4、IL-10 を用いることができる。これら分子の培養系への添加量は、可溶性 hCD40L の場合には 10 μ g/ml 程度、IL-4 および IL-10 の場合には 0.5~50ng/ml 程度が好適である。

培養上清中に分泌された抗体の抗体価と抗体クラスは、抗原をコートしたプレートに被検液を加え、ついで標識した抗ヒト免疫グロブリン各クラス抗体を用いて検出する、ELISA 法により評価することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト CD34 陽性細胞とマウス胸腺ストローマ細胞によるハイブリッド凝集法の概略を示す図である。

図2は、NOD-SCID マウス血清中のヒト抗原特異的抗体価を示す図である。縦軸に各週ごとに採血した血清中の DNP 特異的抗体価を示した。

図3は、抗 DNP-KLH 抗体中における IgM クラスおよび IgG クラス抗体の量を示す図である。縦軸は抗体の量(ng/ml)を表す。

図4は、ヒト CD34 陽性細胞からの T 細胞機能的分化誘導(IL-2 産生能)を示す図である。(A) はヒト・マウスハイブリッド凝集法により *in vitro* で分化したリンパ球を培養したもの、(B) は *in vivo* で分化したリンパ球を培養したものを表す。横軸は移植後から経過した週の数、縦軸は IL-2 の産生量(pg/ml)を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] ヒト臍帯血からの CD34 陽性細胞の分離

ヒト臍帯血を採取し、血球分離液である Ficoll-Hypaque (d=1.077; Amersham Pharmacia) に重層し、2,000 rpm で 30 分間、20°C の条件下で遠心した。2 層の界面に分離されたリンパ球を含む白血球層を採取し、1%BSA-0.02%EDTA を含む PBS (Washing buffer) で 3 回洗浄した。得られた白血球細胞分画を、MACS CD34 immunomagnetic isolation kit (Miltenyi Biotec, Glodbach, Germany) により分離することで、CD34 陽性細胞を得た。すなわち、取り扱い説明書に従い細胞を磁気ビーズでラベルし、洗浄バッファで洗浄した後、MACS separator に VS+ column を装着し、CD34 陽性細胞を分離した。回収した細胞は、RS column で再度ポジティブセレクションを行った。分離した細胞は、細胞数を計測した後、PBS に置換し、以後の操作に用いた。

[実施例2] ヒトリンパ球移入マウスの作製

8週令のNOD/sci-scid(NOD-SCID)マウス(J. Immunol. 154, 180 (1995))を半致死量の3.5 GyのX線で照射し、実施例1で調整したヒトCD34陽性細胞を、一匹当たり500,000個の割合でマウスの尾静脈から移入した。また、移植細胞の生着率を上げる目的で、15GyのX線照射処理したヒト末梢血リンパ球を、一匹当たり500,000個の割合で、アクセサリ細胞としてマウスの尾静脈から移入した。また、同じく移植細胞の生着率を上げる目的で、抗asialoGM1抗体10ml(和光純薬)を、ヒトCD34陽性細胞の移入の1日前、同日、および2日後に腹腔内投与することでマウス由来のNK細胞の活性を低下させた。4週後に、ヒトSCF(20 μ g/kg/day)(Amgen Biologicals)およびG-CSF(25 μ g/kg/day)(Kirin)を4日間腹腔内投与した。

〔実施例3〕 抗原感作および抗体の測定

ヒトCD34陽性細胞移入の6週後に、T細胞非依存性(TI)抗原であるFicoll-DNP(J. Immunol. 114, 704 (1975))50 μ g/head、またはT細胞依存性(TD)抗原であるKLH-DNPまたはOVA-DNP(Methods Med. Res. 10, 94 (1964))25 μ g/headを等量の完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories)と混合して腹腔内投与した。以後2週間間隔で同様に免疫を行った。ただし、アジュバントとして不完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories)を用いた。免疫開始後一週間おきに眼窩採血により血液を採取し、移入したヒト細胞に由来する抗体価、および末梢血中のヒトT細胞とヒトB細胞の出現頻度を測定した。抗体価は、採取した血液から血清を分離し、KLH-DNPをコートしたプラスチックプレートを用いたELISA法により測定した。すなわち、キャリアーと結合したDNPをコートしたプレートを3%BSAにより室温にて2時間ブロッキングし、10-50倍に希釈した血清100 μ l/ウェルを加え、室温で2時間反応させた。リンス緩衝液で洗浄後、ビオチン化抗ヒトIgMまたはIgGモノクローナル抗体3000倍希釈したものを100 μ l/ウェルずつ加え、37°Cで2時間反応させた。洗浄後、5000倍希釈したアビジン化パーオキシダーゼを100 μ l/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。

12

洗浄後、TMB peroxidase EIA substrate kit (BioRad) により、室温で 30 分発色させ、10% HCl にて反応停止後、450nm の吸光度を測定した。

その結果、T 細胞非依存性抗原(TI)である DNP-Ficoll で免疫したマウスでは、DNP 特異的抗体価は、免疫した 5 匹のマウス中 3 匹のマウスにおいて検出され、その内の 1 匹は非常に高い抗体価を示した(図 2 A)。T 細胞依存性抗原 (TD) である DNP-OVA または DNP-KLH で免疫したマウスでは、DNP 特異的抗体価は、DNP-OVA では 4 匹中 1 匹、DNP-KLH では、4 匹全てにおいて高い抗体価が確認された(図 2 B、C)。また、抗 DNP-KLH 抗体中には、IgM クラスの抗体に加え、IgG クラスの抗体が検出された(図 3)。

〔実施例 4〕 ヒト T 細胞とヒト B 細胞の出現頻度の測定

ヒト T 細胞とヒト B 細胞の出現頻度については、採取した末梢血から Ficoll (Pharmacia) によりリンパ球分画を得た後、ヒト T 細胞あるいはヒト B 細胞に特異的な各種抗体による染色を行い、フローサイトメーター(FACS)により測定した。B 細胞については、B 細胞マーカーである PE-抗 CD19 抗体と FITC-抗 CD5 抗体、FITC-抗 IgM 抗体、FITC-抗 IgG 抗体、FITC-抗 CD40 抗体を用いて、B 細胞のサブセットや分化の程度を解析した。T 細胞については、PE-抗 CD2 抗体、FITC-抗 CD3 抗体、FITC-抗 CD4 抗体を用いて解析した(抗体は全て Becton Dickinson)。反応は、0°C、20 分間で行った。FACS 緩衝液で洗浄した後、0.5ml の FACS 緩衝液に懸濁して FACScan (Becton Dickinson)にて各細胞と反応する抗体の蛍光強度を指標に解析した。解析に際して、CD45 陽性細胞にゲートをかけて、各 T あるいは B 細胞マーカーを持つ細胞の割合を算出した。

その結果、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOD-SCID マウスにおけるヒト B 細胞 (CD45 陽性細胞) の全白血球に対する割合は、概ね、脾臓で 30%、骨髄で 40%、末梢血で 2%であった。一方、ヒト T 細胞マーカー陽性細胞は、FACS 解析では検出限界以下であった。尚、マウス T 細胞マーカー、またはマウス B 細胞マーカーを発現する細胞は、ともに 1~2%検出された。

13

〔実施例 5〕 ヒト臍帯血からの T 細胞分化誘導

胎齢 15 日の BALB/c マウス胎児から胸腺を採取し、1.3 mM-デオキシグアノシン(dGuo; Sigma)存在下で nuclepore Track-Etoh Membrane (Corning)の上で 4 日間臓器培養(FTOC)してリンパ球と樹状細胞を除去した。培地からデオキシグアノシンを除いて、さらに 1 日培養した後、胸腺組織を 0.25%トリプシン(sigma)および 0.02%EDTA (和光純薬)を含む PBS で処理して、遊離した胸腺支持上皮細胞(ストローマ細胞)を得た。ストローマ細胞をヒト CD34 陽性細胞と 1:4 の割合で混合した後、2000rpm で遠心し、得られた凝集塊(human/mouse hybrid reaggregate; hu/m hybrid)を nuclepore Track-Etoh Membrane 上で 2 週間培養した(RTOC)。2 週間 RTOC を行った後、hu/m hybrid を NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植した。移植した hu/m hybrid 内でのヒト T 細胞の分化状態を T 細胞特異抗体(抗 CD1a, 抗 CD4, 抗 CD8, 抗 CD3, 抗 CD45)を用いて FACScan にて解析した。

その結果、マウス胸腺ストローマ細胞との凝集培養(RTOC)により、ヒト CD34 陽性細胞は、CD4 陽性および CD8 陽性の成熟 T 細胞に分化したことが判明した。

また、*in vitro*の培養だけでは、増殖能や IL-2 産生能等の機能的分化はほとんど誘導されなかった(図 4 A)。しかしながら、RTOC に続いて凝集培養塊を NOD-SCID の腎皮膜下に移植すると、細胞増殖能は著しく亢進し、また、IL-2 産生能も獲得することが示された(図 4 B)。この結果は、種を越えて胸腺ストローマ細胞が T 細胞の分化誘導能を有することを示したこれまでの報告を確認したことに加え、さらに、*in vivo*というより生理的条件下では、機能的分化が可能であることを初めて明らかにした。

なお、本実施例における IL-2 産生能の測定は、PMA(phorbol myristate acetate)および IM(ionomycin)の刺激によって培養上清中に産生された hIL-2 濃度を ELISA キットにより測定した。すなわち、腎被膜下に移植した再凝集構築物を無菌的に切り出し、ナイロンメッシュを用いて不要な細胞塊および死細胞塊を除去することで、リンパ球を主体とした細胞浮遊液を調製した。これら細胞を RPMI

14

培養液で $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整した後、U 底 96 穴プレートに 100 μl /ウエルで播種した。PMA(終濃度 20ng/ml)+IM(終濃度 200ng/ml)を各ウエルに添加し、24 時間 37°C で培養した後、上清を回収した。測定には IL-2 測定用 ELISA キット (Endogen Human Interleukin-2 ELISA kit)を用いた。

〔実施例 6〕 抗ヒト CD40 抗体を用いたヒト IgG 抗体産生

実施例 2 に記載の方法でヒト CD34 陽性細胞移入マウスを作製し、8 週後に、上記マウスに DNP-KLH(100 μg)を腹腔内に投与 (初回免疫)すると共に、抗ヒト CD40 抗体(20 μg) (5C3 : Pharmingen 社) を皮下投与した。その後、抗ヒト CD40 抗体(20 μg)のみを隔日投与により 11 週目まで計 10 回投与を続けた。11 週目に、DNP-KLH を再度腹腔内投与した (ブースター)。12 週目に上記マウスより脾臓を麻酔下で摘出し、以下の解析をおこなった。すなわち (1) 末梢リンパ組織におけるヒトリンパ球の同定、及び (2) マウス末梢血および、脾臓細胞培養液中の抗原特異的ヒト抗体の測定 (ELISA)。末梢リンパ組織におけるヒトリンパ球の同定は実施例 4 に記載の方法で、また、抗原特異的抗体の測定は実施例 3 に記載の方法で行った。

その結果、(1) 抗ヒト CD40 抗体投与キメラマウスでは、末梢血中のヒト B 細胞の割合は変化がなかったが、骨髓や脾臓ではヒト B 細胞の割合が増加する傾向を示した。(2) 抗原特異的抗体〔抗 DNP 抗体〕は、抗ヒト CD40 抗体投与により著しく昂進した。このうち、IgM が主たるアイソタイプであるが、IgG の昂進の傾向にあった。以上の結果は、ヒト CD34+幹細胞がマウス末梢組織で B 細胞が分化してクローンレベルで増殖していることを示す。また、抗ヒト CD40 抗体の投与は抗体産生の B 細胞クローンの増殖を促進するのみならず、IgG 抗体産生にも有効であることを示した。

産業上の利用の可能性

本発明により、ヒト CD34 陽性細胞が移入されたヒト抗体産生能を有するキメラマウス、その作製方法、および該キメラマウスを用いたヒト抗体の調製方法が提供された。

本発明のキメラマウスは、従来のヒト末梢血リンパ球(PBL)を移入して作製したキメラマウスと異なり、未分化な造血幹細胞が移入され、その体内においてリンパ球が分化している。このリンパ球は、従来法におけるヒト末梢血リンパ球のように自己（ヒト）に適応していない。このため本発明のキメラマウスは、ヒト自己成分を含む任意の抗原に対するヒト抗体の作製が可能である。

また、ヒト CD34 陽性細胞には EBV(Epstein-Barr virus)の受容体が存在しないため、CD34 陽性細胞を移入した本発明のキメラマウスには EBV の混在がない。

さらに、末梢血リンパ球に存在する樹状細胞の抗原提示能は低いことが知られており、効率的な免疫反応を惹起しにくいのに対し、本発明のキメラマウスでは、造血幹細胞を移入しているため、B 細胞、T 細胞および樹状細胞等の免疫担当細胞が継続的に分化、増殖し、長期間にわたる免疫を行うことができる。

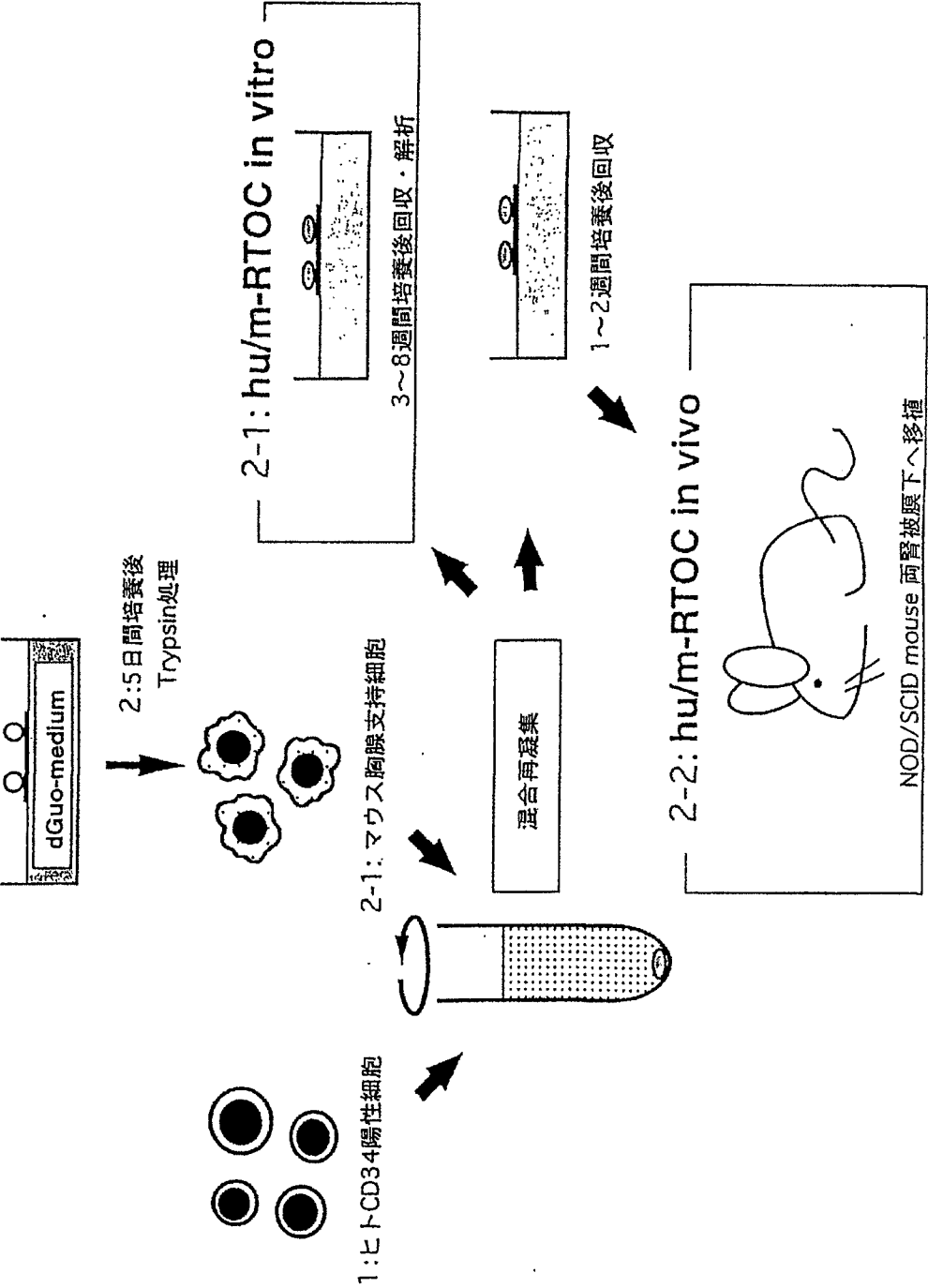
さらに、本発明で得られる抗体は、糖鎖部分を含む完全なヒト免疫グロブリン成分で構成される。現在報告されているヒト抗体遺伝子導入トランスジェニックマウスでは、マウス B 細胞に抗体を産生させるため、マウス型糖鎖が結合している。従って、反復投与が必要となる医薬品においては、抗マウス型糖鎖抗体が産生される可能性があった。これに対し、本発明により作製されるヒト抗体は、ヒト型の糖鎖を有するため、このような中和抗体の産生が起こり難く、有用性が高い。

また、本発明においてヘルパー因子を用いることにより、結合活性の高い IgG クラスの抗体を取得することが可能である。このことは、抗体を医薬品として用いる場合に、生産方法や精製の容易さから非常に有意義である。

請求の範囲

1. SCID マウスにヒト CD34 陽性細胞を移入することを特徴とする、ヒト抗体産生能を有するキメラマウスの作製方法。
2. SCID マウスに、ヒト CD34 陽性細胞の移入に加えて、さらにハイブリッド凝集法により調製された CD34 陽性細胞を移入することを含む、請求項 1 に記載の方法。
3. ヒト CD34 陽性細胞が、ヒト臍帯血由来である請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法により作製されたキメラマウス。
5. ヒト由来の成熟 B 細胞および成熟 T 細胞を有し、ヒト抗体産生能を有するキメラマウス。
6. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法により作製された請求項 5 に記載のキメラマウス。
7. ヒト CD34 陽性細胞に由来するヒト T 細胞および／または B 細胞を持続的に保持するキメラマウス。
8. ヒト抗体を調製する方法であって、
 - (a) 請求項 4 から 7 のいずれかに記載のキメラマウスまたは該キメラマウスから調製されたリンパ球を抗原で免疫する工程、および
 - (b) 工程 (a) における免疫により産生された、該抗原に結合するヒト抗体を回収する工程、を含む方法。
9. 工程 (a) において、CD40 を活性化する物質の、キメラマウスへの投与またはリンパ球への接触を行う、請求項 8 に記載の方法。
10. 請求項 8 または 9 に記載の方法により調製されたヒト抗体。
11. 抗体のクラスが IgG である、請求項 10 に記載の抗体。

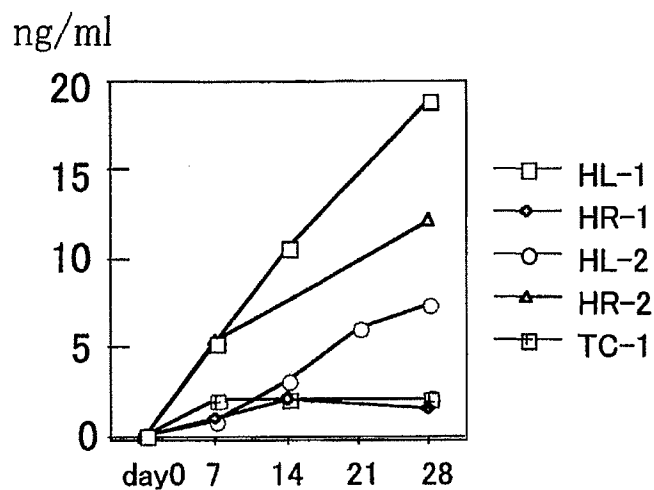
図 1



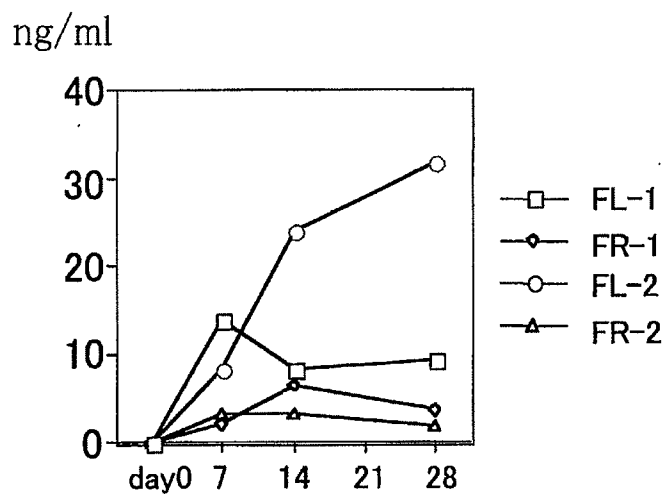
2 / 4

図 2

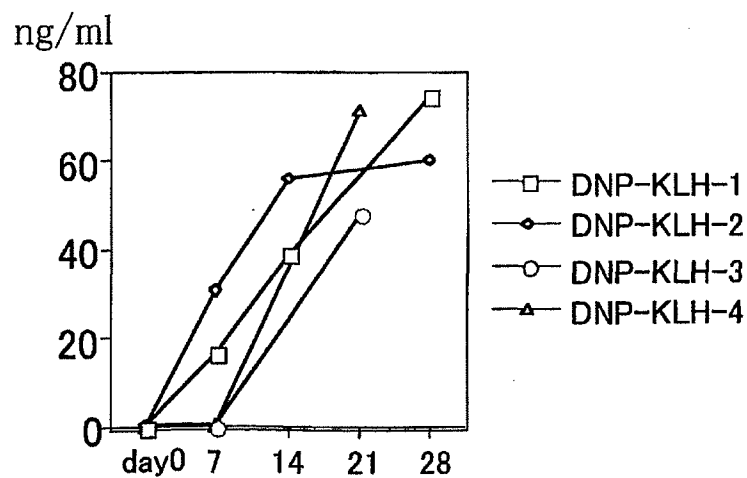
A. DNP-Ficoll



B. DNP-OVA

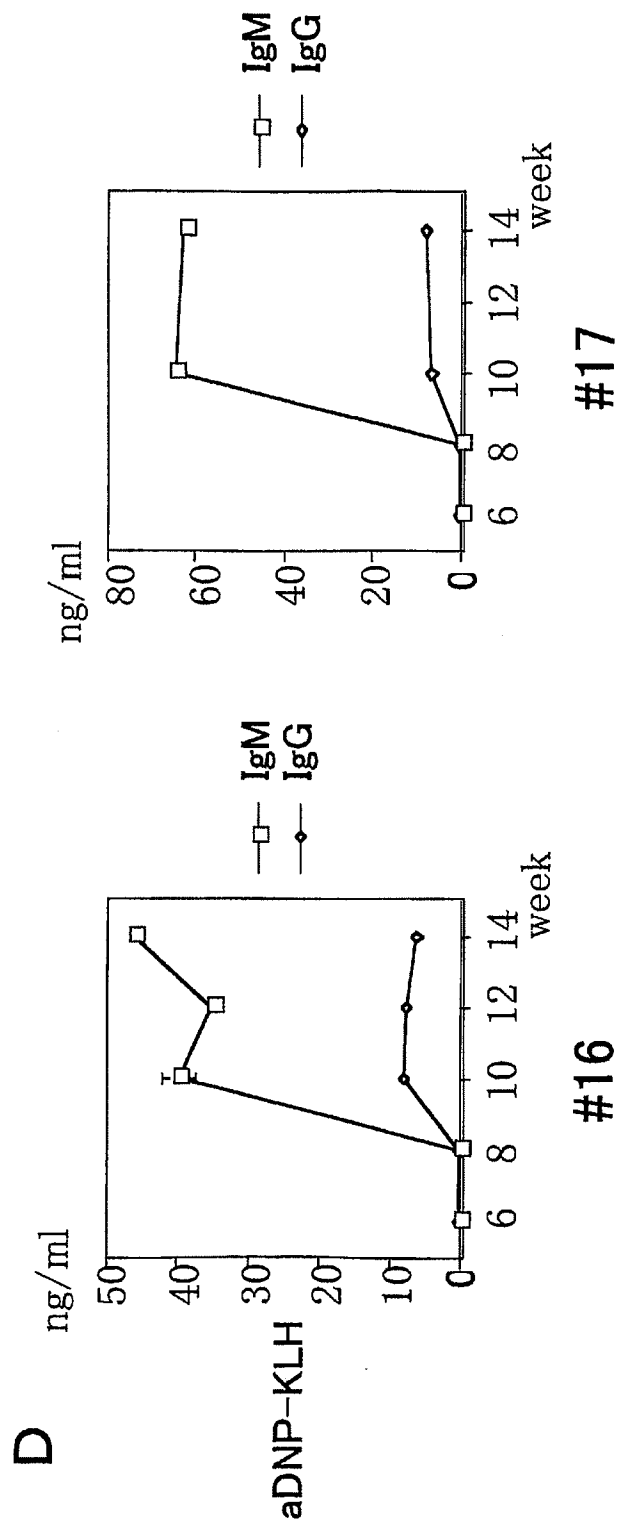


C. DNP-KLH



3 / 4

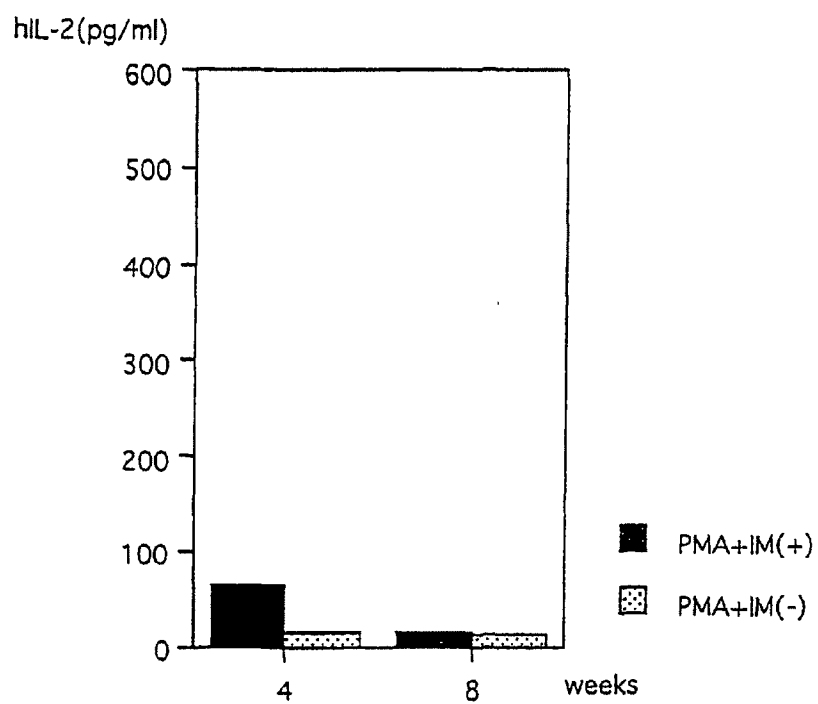
図 3



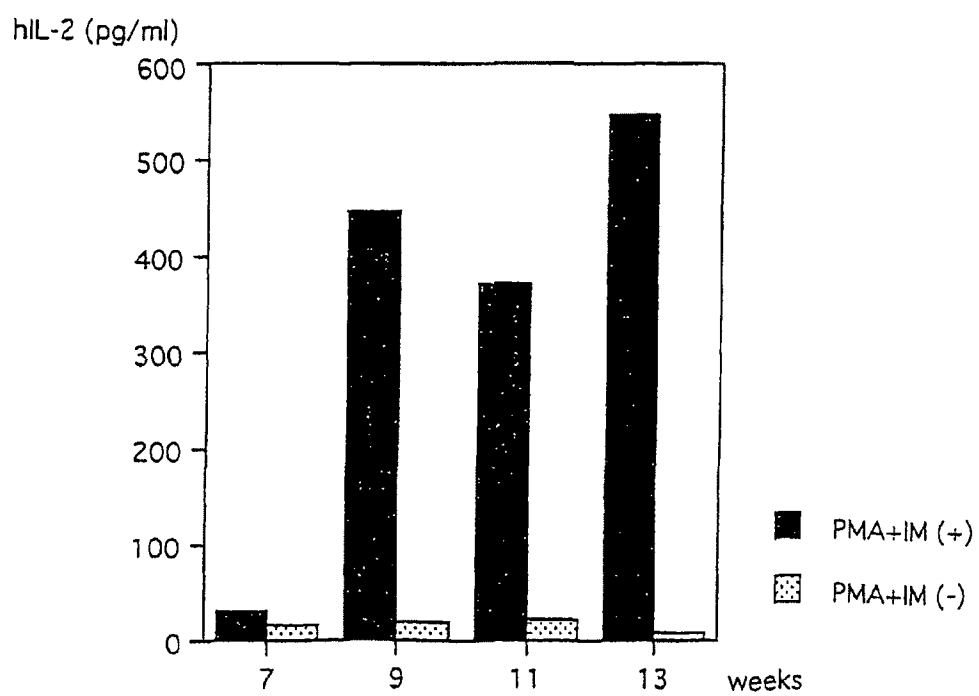
4 / 4

図 4

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12P 21/08, C07K 16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12P 21/08, C07K 16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DiGiusto D. et al., Blood, Vol.84, pages 421 to 432, (1994)	1-7
Y		8-11
X	Nakamura Y. et al., Blood, Vol.94, pages 4053 to 4059, (1999)	1-7
Y		8-11
X	Verlinden S. F. F. et al., Experimental Hematology, Vol.26, pages 627 to 630, (1998)	1-7
Y		8-11
Y	Chen F-A. et al., J. Immunol., Vol.155, pages 2833 to 2840, (1995)	1-7
X		8-11
Y	Hutchins W. A. et al., Hybridoma, Vol.18, pages 121 to 129 (1999)	1-7
X		8-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 June, 2001 (22.06.01)Date of mailing of the international search report
03 July, 2001 (03.07.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/04034	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ A01K 67/027, C12P 21/08, C07K 16/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ A01K 67/027, C12P 21/08, C07K 16/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPIDS			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	DiGiusto D. et al., Blood, vol.84, p.421-432 (1994)	1-7 8-11	
X Y	Nakamura Y. et al., Blood, vol.94, p.4053-4059 (1999)	1-7 8-11	
X Y	Verlinden S.F.F. et al., Experimental Hematology, vol.26, p.627-630 (1998)	1-7 8-11	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22.06.01		国際調査報告の発送日 03.07.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3236	

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)